

· 论 著 ·

LPSp 对狂犬病疫苗佐剂效应及安全性研究^{*}

王启辉¹, 申继清², 王 健³, 冷 静^{4△}

(1. 广西医科大学免疫学教研室, 南宁 530021; 2. 广西医科大学寄生虫学教研室, 南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院临床医学实验部, 南宁 530021; 4. 广西中医学院基础医学院, 南宁 530001)

摘 要:目的 研究成团泛菌脂多糖(LPSp)作为狂犬病疫苗佐剂的可行性。方法 将 Balb/c 小鼠 32 只随机分为空白对照组(注射生理盐水)、LPSp 对照组(注射 LPSp)、狂犬病病毒蛋白组(注射狂犬病病毒蛋白)、LPSp 实验组(注射 LPSp 和狂犬病病毒蛋白), 分别在第 0、7、15、21 天经背部皮下免疫接种共 4 次。在免疫接种后第 7、14、21、30、45、60 天采集小鼠眼内眦静脉血, 分离血清, 末次采血后处死小鼠。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清抗狂犬病病毒 IgG, 并进行血液学、血液生化、脏器指数等检查。结果 免疫接种 4 次后, LPSp 能明显增强狂犬病病毒蛋白免疫小鼠产生 IgG 的能力($P < 0.05$); 实验期间各组小鼠未发现明显异常表现, 体质量、血液学、血液生化和脏器指数等各组间未见明显差异($P > 0.05$)。结论 LPSp 对狂犬病病毒蛋白具有较好佐剂效应; 在本实验条件下, LPSp 对小鼠安全性好。

关键词:脂多糖类; 毒性试验; 狂犬病病毒; 佐剂, 免疫

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.36.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)36-3643-03

A study of adjuvant effect and safety of LPSp on rabies vaccine^{*}

Wang Qihui¹, Shen Jiqing², Wang Jian³, Leng Jing^{4△}

(1. Department of Immunology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Parasitology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 4. Department of Basic Medical Sciences, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi 530001, China)

Abstract:Objective To explore the feasibility of Pantoea agglomerans lipopolysaccharide (LPSp) serving as rabies vaccine adjuvant. Methods 32 Balb/c mice were randomly divided into blank control group (injection of physiological saline), LPSp control group (injection of LPSp), rabies virus protein group (injection of rabies virus protein) and LPSp group (injection of LPSp and rabies virus protein). Totally 4 times subcutaneous vaccination in back were conducted on the 0 th, 7 th, 15 th and 21th day, respectively. Venous blood samples were collected from eye canthus of mice on the 7 th, 14 th, 21 th, 30 th, 45 th and 60 th day after vaccination, serum were separated, and the mice were sacrificed after the last blood collection. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was employed to detect the serum anti-rabies virus IgG, and hematological test, blood biochemical test as well as viscera index assessment were also conducted. Results After 4 times vaccination, LPSp significantly improved the ability of mice immunized with rabies virus protein to produce IgG ($P < 0.05$). No obvious abnormalities were found in mice in each group during experiment. No significantly differences were found among groups in hematological test, blood biochemical test and viscera index assessment ($P > 0.05$). Conclusion LPSp exerts a good adjuvant effect on rabies virus protein and shows safety for mice under this experimental condition.

Key words: lipopolysaccharides; toxicity tests; rabies virus; adjuvants; immunologic

狂犬病是一种危害极大的人兽共患病, 目前人感染狂犬病病毒后一旦发病, 病死率高达 100%, 故现今防治狂犬病极为关键和有效的措施为暴露后进行疫苗接种。尽管现用狂犬病疫苗安全、有效, 但尚存在疫苗蛋白免疫原性较弱、单独使用需较大剂量和较复杂的接种程序、接种后抗体产生较迟及维持时间短等不足^[1-2]。因此有必要对现有狂犬病疫苗进行改进, 提高疫苗免疫效果, 以便更有效地预防和控制狂犬病病毒感染。本研究室前期研究发现成团泛菌脂多糖 (pantoea agglomerans lipopolysaccharide, LPSp) 对乙型肝炎病毒表面抗原具有较好的佐剂效应^[3-4], 提示 LPSp 是一种很有潜力的疫苗佐剂。为此, 本研究尝试使用 LPSp 作为狂犬病疫苗佐剂, 以探讨其对狂犬病疫苗免疫效果及对实验动物长期损害的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 动物: 健康纯系 Balb/c 雌性小鼠 32 只 (体质量 17~21 g) 由广西医科大学实验动物中心提供, 清洁级, 动物合格证号: 桂动许字 2000 第 001 号。(2) 试剂及仪器: LPSp 由广西医科大学免疫学教研室提供; 狂犬病病毒蛋白为辽宁生物技术公司产品, 抗原含量 2.5 IU/mL; AP 标记羊抗小鼠购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 抗狂犬病病毒标准阳性血清由广西大学动物研究中心赠送; 96 孔酶标板购自美国 Costar 公司; Thermo Multiskan Ascent 全自动酶标仪、Beckman Coulter LH750 血液分析仪、Beckman LX-20 型全自动血生化分析仪均为美国产品。

1.2 方法

^{*} 基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (桂科青 0135012); 广西医科大学博士启动基金资助项目 (2004)。 △ 通讯作者, Tel: (0771) 3131265; E-mail: ljgxy@yahoo.com.cn。

1.2.1 动物分组及免疫 将 Balb/c 小鼠随机分为空白对照组、LPSp 对照组、狂犬病病毒蛋白组、LPSp 实验组,每组 8 只。分别在第 0、7、15、21 天经背部皮下免疫接种,空白对照组注射生理盐水,LPSp 对照组注射 LPSp 10 微克/只,狂犬病病毒蛋白组注射狂犬病病毒蛋白 0.5 IU/只,LPSp 实验组注射 LPSp 10 微克/只和狂犬病病毒蛋白 0.5 IU/只,LPSp 和狂犬病病毒蛋白注射时分别用生理盐水稀释,每只均注射 0.2 mL。

表 1 各组小鼠免疫后不同时间点抗狂犬病病毒 IgG 滴度比较($\bar{x}\pm s,n=8$)						
组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 30 天	第 45 天	第 60 天
空白对照组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
LPSp 对照组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
狂犬病病毒蛋白组	2.806±0.193	3.048±0.139	3.282±0.161	3.489±0.158	3.615±0.158	3.908±0.161
LPSp 实验组	2.962±0.267	3.248±0.158	3.546±0.158*	3.708±0.193*	3.848±0.158*	4.102±0.139*
*:P<0.05,与狂犬病病毒蛋白组比较。						

表 2 免疫后第 60 天各组小鼠血液学检查结果($\bar{x}\pm s,n=8$)					
组别	WBC($\times 10^9/L$)	L(%)	M(%)	RBC($\times 10^{12}/L$)	Hb(g/L)
空白对照组	1.32±0.39	54.60±18.22	3.60±0.39	3.53±0.43	57.17±7.73
LPSp 对照组	1.25±0.38	47.75±12.71	3.35±0.61	3.84±0.62	59.50±6.76
狂犬病病毒蛋白组	1.57±0.26	51.50±13.05	4.03±0.84	3.49±0.59	53.00±8.90
LPSp 实验组	1.28±0.25	46.00±12.27	3.20±0.48	3.61±0.75	53.60±12.18

续表 2 免疫后第 60 天各组小鼠血液学检查结果($\bar{x}\pm s,n=8$)					
组别	Hct(%)	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)
空白对照组	17.17±1.22	48.88±2.95	16.13±1.46	331.33±25.69	381.33±64.24
LPSp 对照组	18.22±1.82	48.90±3.52	15.97±0.62	326.25±12.97	392.25±44.79
狂犬病病毒蛋白组	16.08±2.55	46.18±1.57	15.20±0.84	329.33±10.37	467.33±184.63
LPSp 实验组	16.34±2.94	45.48±3.17	14.76±1.08	325.40±18.02	433.20±108.75

表 3 免疫后第 60 天各组小鼠血液生化检查结果($\bar{x}\pm s,n=8$)						
组别	GLU(mmol/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	vLDL-C(mmol/L)
空白对照组	1.90±1.22 [△]	5.13±2.59	105.80±35.05	1.86±0.65	1.14±0.29	0.52±0.13
LPSp 对照组	3.13±1.40	5.53±1.08	45.00±15.21 [#]	2.20±0.55	1.26±0.30	0.57±0.13
狂犬病病毒蛋白组	1.22±0.99 [△]	5.61±1.67	53.60±12.93 [#]	1.50±0.72	1.25±0.49	0.56±0.22
LPSp 实验组	1.57±0.78 [△]	4.99±2.08	39.67±22.03 [#]	1.41±0.33	1.35±0.55	0.61±0.25

续表 3 免疫后第 60 天各组小鼠血液生化检查结果($\bar{x}\pm s,n=8$)						
组别	TP(g/L)	A(g/L)	A/G	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
空白对照组	54.93±17.66	25.75±8.40	0.89±0.17	130.00±34.51	41.67±18.06	53.33±13.01
LPSp 对照组	69.45±7.36	31.47±2.29	0.86±0.17	114.33±55.34	37.00±9.24	58.67±8.21
狂犬病病毒蛋白组	51.30±19.05	24.97±12.75	0.90±0.26	121.00±74.73	42.00±15.14	51.75±10.90
LPSp 实验组	63.18±2.91	30.66±3.52	0.94±0.11	137.25±30.02	36.20±6.18	50.50±14.43

△:P<0.05,与 LPSp 对照组比较;#:P<0.01,与空白对照组比较。

表 4 免疫后第 60 天各组小鼠脏器指数比较($\bar{x}\pm s,\text{mg/g},n=8$)						
组别	胸腺	心	肝	脾	肺	肾
空白对照组	0.98±0.19	5.04±1.05	51.07±8.75	6.39±1.43	6.43±0.49	11.21±1.74
LPSp 对照组	0.88±0.15	5.58±1.25	44.96±12.65	5.75±1.12	7.51±1.22	11.20±2.00
狂犬病病毒蛋白组	0.85±0.18	5.07±0.44	42.83±6.58	5.29±1.28	6.54±0.63	11.11±1.26
LPSp 实验组	0.76±0.24	5.21±0.97	42.26±2.43	6.09±0.74	6.72±1.01	12.47±0.56

1.2.2 血清抗狂犬病病毒抗体检测 初次免疫后第 7、14、21、30、45、60 天,经眼内眦静脉取血,分离血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗狂犬病病毒 IgG 滴度。设阳性、阴性和空白对照,以免免疫小鼠血清为阴性对照,抗狂犬病病毒标准阳性血清为阳性对照。抗体最高稀释度的计算以检测值/阴性对照值(P/N)≥2.1 为准,实验测定值取组内小鼠测定值的几何平均值。

1.2.3 LPSp 对小鼠长期损害观察 (1)一般症状:观察动物的外表特征和行为活动,精神、神经、呼吸、循环、消化道症状,粪便性状及体质量等。体质量 15 d 测 1 次,其他指标每天至少检查 1 次。(2)血液学检测:免疫后第 60 天,采集每组小鼠血样,测定白细胞总数(WBC)及分类[淋巴细胞(L)、单核细胞计数(M)、红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、血细胞比容(Hct)、平均红细胞容积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、血小板(PLT)等 10 项血液学指标。(3)血液生化检测:免疫后第 60 天,采集每组小鼠血样,测定血糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、极低密度脂蛋白胆固醇(vLDL-C)、总蛋白(TP)、清蛋白(A)、清蛋白/球蛋白比值(A/G)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)等项目。(4)系统解剖检查:免疫后第 60 天,剖杀每组小鼠,取处死小鼠实质性器官,包括胸腺、心、肝、脾、肺和肾称质量,计算脏器指数[脏器指数=器官质量(mg)/体质量(g)],并进行系统解剖检查。

1.3 统计学处理 以 SPSS13.0 进行统计处理分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数的两两比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPSp 对狂犬病疫苗佐剂效应观察 初次免疫后 LPSp 实验组 IgG 滴度在第 21 天及以后各时间点均明显高于狂犬病病毒蛋白组($P < 0.05$),4 次免疫后,两组均在第 60 天还呈明显上升趋势,高滴度抗体至少维持 8 周以上,提示 LPSp 能明显促进狂犬病病毒蛋白 IgG 的产生,见表 1。

2.2 LPSp 对小鼠的长期损害观察

2.2.1 一般症状 试验期间,LPSp 对照组、狂犬病病毒蛋白组和 LPSp 实验组动物一般活动、外观、食量、体质量等与空白对照组比较均未见明显改变。试验结束后各组体质量较实验开始时均有所增加,各时间点体质量与空白对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.2 血液学检查 受试动物 WBC 及分类、RBC、Hb、Hct、MCV、MCH、MCHC、PLT 等分别在各组间比较未见明显变化($P > 0.05$),见表 2。

2.2.3 血液生化检查 免疫后第 60 天,LPSp 对照组 GLU 水平显著高于其余 3 组($P < 0.05$);空白对照组 Gr 水平显著高于其余 3 组($P < 0.01$);其他血液生化指标 BUN、TC、TG、vLDL-C、TP、A、A/G、AST、ALT、ALP 等各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.2.4 脏器指数 对实验小鼠进行剖检,各组动物的主要器官均未见明显病理性改变,受试小鼠脏器质量及脏器指数各组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

3 讨 论

脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)具有很好的免疫调节潜能^[5],但 LPS 大多具有较强毒性,限制了它在医疗保健方面的

应用。细菌脂质 A 是 LPS 生物活性部分,近年研究较多的脂质 A 衍生物——单磷酸脂质 A 具有强大的佐剂效应,而其毒性只有 LPS 的 0.1%,说明 LPS 可开发利用为人类健康服务^[6-7]。有研究发现,LPS 可刺激体内相应 Toll 受体,引起不同的免疫反应^[8];不同细菌的脂质 A 结构不尽相同^[9];脂质 A 的结构是决定细菌生物活性的一个重要因素^[10]。本研究所用的 LPSp 来源于小麦粉中革兰阴性非致病菌——成团泛菌,经鉴定,LPSp 至少有两种脂质 A 结构,其生物学活性较单种脂质 A 结构的 LPS 要强^[11],它在体内不易降解,对肿瘤、溃疡、烧伤、疱疹等多种疾病有很好的疗效^[12-13]。经急性毒性、刺激性、致敏性及遗传毒性试验,LPSp 未发现有相应毒性作用^[14],给肿瘤患者皮内注射 LPSp 显示有抗肿瘤活性且无不良反应^[15],动物实验显示,LPSp 对免疫功能有明显的增强作用^[16],且对乙型肝炎病毒表面抗原具有良好的佐剂效应^[3-4]。提示 LPSp 具有较好的临床应用潜能。

本研究结果显示,在本实验条件下,LPSp 与狂犬病病毒蛋白合用能明显提高小鼠产生抗狂犬病病毒蛋白 IgG 水平,再次验证了 LPSp 的佐剂效应。另外,为了解本实验条件下 LPSp 对小鼠机体是否有长期损害,实验期间观察记录了小鼠的一般状况,观察结束时,处死动物采集相关标本进行了血液学、血生化、脏器指数等检查。结果显示,各组未见明显损伤反应,动物一般症状、血液学和血液生化、器官质量及脏器指数、解剖检查等指标各组均无明显异常。个别血生化指标与对照组有差异,考虑并非由 LPSp 损伤所致,应为偶发现象。如 LPSp 对照组 GLU 水平显著高于空白对照组、狂犬病病毒蛋白组及 LPSp 实验组,但加同剂量 LPSp 的 LPSp 实验组与狂犬病病毒蛋白组、空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),这很难解释 GLU 的变化与 LPSp 的作用有关,具体有待进一步验证;而空白对照组 Gr 水平显著高于其余 3 组,可能是小鼠的自然病变所致。

以上结果表明,在本试验条件下 LPSp 对狂犬病病毒蛋白具有良好的佐剂效应,LPSp 对小鼠机体未见明显的长期损害,但由于受实验条件限制,暂时未能进行完整的小鼠亚急性毒性实验,LPSp 的长期毒性尚有待进一步研究。本研究及前期研究结果提示,LPSp 对多种人用疫苗蛋白具有良好的佐剂效应,不仅可用于狂犬疫苗,也可用于其他疫苗,具有一定的广谱性,同时具有安全性高、性质稳定、生产工艺简单等优点,是一种值得深入研发的新型疫苗佐剂。

参考文献:

- [1] 林海祥, Perrin P. 铝佐剂对实验狂犬病疫苗的影响[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(2): 133-135.
- [2] 俞永新. 国内外狂犬病疫苗的发展和现状[J]. 上海预防医学杂志, 2006, 18(5): 216-218.
- [3] Leng J, Wang QH, Wang J, et al. The regulatory effect of LPSp on hepatitis B surface antibody[J]. Chin J Chro Dis, 2004, 3(4): 84-88.
- [4] 王健, 冷静, 王启辉. LPSp 辅佐 HBsAg 诱导机体产生特异性抗体的机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(6): 559-561.
- [5] Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(2): 169-176.

FEBS Lett,1997,404(2/3):249-252.

- [11] Rey M,Irondelle M,Waharte F,et al. HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells[J]. *Eur J Cell Biol*,2011,90(2/3):128-135.
- [12] Chatzistamou I,Dioufa N,Trimis G,et al. p21/waf1 and smooth-muscle actin α expression in stromal fibroblasts of oral cancers[J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*,2010,33(1):19-26.
- [13] Jiang X,Gillen S,Esposito I,et al. Reduced expression of the membrane skeleton protein beta 1-spectrin(SPTBN1) is associated with worsened prognosis in pancreatic cancer[J]. *Histol Histopathol*,2010,25(12):1497-1506.
- [14] Toivola DM,OmaryMB,Ku NO,et al. Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity[J]. *Hepatology*,1998,28(1):116-128.
- [15] Toivola DM,Ku NO,Resurreccion EZ,et al. Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease[J]. *Hepatology*,2004,40(2):459-466.
- [16] Wang X,Wang S,Tang X,et al. Development and evaluation of monoclonal antibodies against phosphatidyl-lethanolamine binding protein 1 in pancreatic cancer patients[J]. *Immunol Methods*,2010,362(1/2):151-160.
- [17] Xu YF,Yi Y,Qiu SJ,et al. PEBP1 downregulation is associated to poor prognosis in HCC related to hepatitis B infection[J]. *Hepatol*,2010,53(5):872-879.
- [18] 沈子律,许啸声,李稻. 泛素蛋白酶体及其抑制[J]. *现代肿瘤医学*,2006,14(11):1454-1457.

- [19] 黄源. 机体铁超载与肿瘤[J]. *癌症*,1994,13(4):368-371.
- [20] 豪侠,张奕伯. 肺癌患者血清 CYFRA2121、铁蛋白、铁检测的临床意义[J]. *肿瘤学杂志*,2001,7(3):156-157.
- [21] Armstrong T,Strommer L,Ruiz-Jasbon F,et al. Pancreaticoduodenectomy for peri-ampullary neoplasia leads to specific micronutrient deficiencies[J]. *Pancreatol*,2007,7(1):37-44.
- [22] Heise N,Palme D,Misovic M,et al. Non-Selective Cation Channel-Mediated Ca-Entry and Activation of Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Kinase II Contribute to G2/M Cell Cycle Arrest and Survival of Irradiated Leukemia Cells[J]. *Cell Physiol Biochem*,2010,26(4/5):597-608.
- [23] Kizhatil K,Davis JQ,Davis L,et al. Ankyrin-G is a molecular partner of E-cadherin in epithelial cells and early embryos[J]. *Biol Chem*,2007,282(36):26552-26561.
- [24] Hedstrom KL,Ogawa Y,Rasband MN. AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity[J]. *Cell Biol*,2008,183(4):635-640.
- [25] Ayalon G,Davis JQ,Scotland PB,et al. An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan[J]. *Cell*,2008,135(7):1189-1200.
- [26] Kizhatil K,Baker SA,Arshavsky VY,et al. Ankyrin-G promotes cyclic nucleotide-gated channel transport to rod photoreceptor sensory cilia[J]. *Science*,2009,323(5921):1614-1617.
- [27] Martinez-Azorin F,Remacha M,Ballesta JP. Functional characterization of ribosomal P1/P2 proteins in human cells[J]. *Biochem*,2008,413(3):527-534.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-08-12)

(上接第 3645 页)

- [6] Casella CR,Mitchell TC. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant[J]. *Cell Mol Life Sci*,2008,65(20):3231-3240.
- [7] Evans JT,Cluff CW,Johnson DA,et al. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi. 529[J]. *Expert Rev Vaccines*,2003,2(2):219-229.
- [8] 金生,张大志,陈压西. Toll 样受体研究进展与临床免疫[J]. *重庆医学*,2004,33(9):1423-1426.
- [9] Caroff M,Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides[J]. *Carbohydr Res*,2003,338(23):2431-2447.
- [10] Montminy SW,Khan N,McGrath S,et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response[J]. *Nat Immunol*,2006,7(10):1066-1073.
- [11] 冷静,叶峻,黎肇炎,等. 成团泛菌低分子脂多糖的分离纯

化和鉴定[J]. *广西医科大学学报*,2003,20(6):840-842.

- [12] Iwamoto I,Goto S,Kera J,et al. Mechanistic analysis of high antitumor effect of intradermal administration of lipopolysaccharide from *Pantoea Agglomerans* [J]. *Med Oncol*,1996,13(2):103-109.
- [13] 梁自乾,李德绘,韦俊,等. LPS 霜剂在烧伤创面的应用[J]. *广西医科大学学报*,2000,17(1):16-17.
- [14] 王启辉,申继清,韦锦斌,等. 成团泛菌低分子脂多糖的急性毒性、刺激性、致敏性及遗传毒性评估[J]. *基因组学与应用生物学*,2011,30(2):175-183.
- [15] Goto S,Sakai S,Kera J,et al. Intradermal administration of lipopolysaccharide in treatment of human cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*,1996,42(4):255-261.
- [16] 黄志明,黄仁彬,陈家欢,等. 小麦非致病菌脂多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. *广西医科大学学报*,2002,19(2):195-197.

(收稿日期:2011-05-31 修回日期:2011-09-12)